

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

PRIORITY DOCUMENT

REC'D 14 FEB 1996
WIPO PCT

08/860231

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 23 JAN. 1996

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef de Division

Yves CAMPENON

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : (1) 42 94 52 52
Télécopie : (1) 42 93 59 30

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

**REQUETE
EN DÉLIVRANCE D'UN
TITRE DE PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE ***

DATE DE REMISE DES PIÈCES 09 JAN. 1995	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 95 00329	DATE DE DÉPÔT 09 JAN. 1995
CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT 75	4 NOMBRE DU POUVOIR PERMANENT

1

<input checked="" type="checkbox"/> a	BREVET D'INVENTION
<input type="checkbox"/> b	CERTIFICAT D'UTILITÉ
<input type="checkbox"/> c	DEMANDE D'INVENTAIRE
<input type="checkbox"/> d	TRANSMISSION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

Pour a et b, précisez : Nature, N° et date de la demande initiale

2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité):

LE DEMANDEUR REQUIERT
L'ÉTABLISSEMENT DIFFÉRE
DU RAPPORT DE RECHERCHE

 OUI
 NON

SI L'OPTION CHOISIE EST NON ET
SI LE DEMANDEUR EST UNE
PERSONNE PHYSIQUE, IL
REQUIERT LE PAIEMENT
ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE
DE RAPPORT DE RECHERCHE

 OUI
 NON

NATURE

NUMERO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE

3 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE A QUI TOUTE LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADDRESSEE

Cabinet GERMAIN & MAUREAU
B.P. 3011
69392 LYON CEDEX 03
FRANCE

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

MD/MK/T 12 B 1998 FR

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

72 60 28 90

7 TITRE DE L'INVENTION

Milieu nutritif utilisable comme milieu de culture de cellules épidermiques et
base nutritive à usage topique

8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

N° SIREN

THOREL Jean-Noël

9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

3 rue de la Rochelle
75014 PARIS

PAYS

FRANCE

10 NATIONALITÉ(S)

française

11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE
INVENTEUR

 OUI
 NON

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE
PHYSIQUE NON IMPOSABLE, IL
REQUIERT OU A REQUIS LA REDUCTION
DES REDEVANCES*

 OUI
 NON

13 DECLARATION DE PRIORITÉ
OU REQUETE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTERIEURE

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMERO

14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES À LA
PRÉSENTE DEMANDE

N°

N°

N°

N°

**15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
NOM ET QUALITÉ DE SIGNATAIRE EN INSCRIPTION**

Dominique GUBRE
CPI 981104
Vnu

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

D. GIRAUD

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

Cocher la case choisie

LES ENCADRÉS GRAS SONT RÉSERVÉS À L'ADMINISTRATION

La présente invention concerne une composition à usage topique, comprenant de manière générale une phase bio-compatible avec les parties superficielles du corps humain, dans laquelle est distribué ou réparti de manière homogène un agent nutritionnel desdites parties superficielles.

Plus précisément, l'invention a pour objet une composition à usage topique, permettant de créer un environnement extra-cellulaire parfaitement adapté à l'épiderme.

De manière générale, conformément à l'invention l'agent nutritionnel consiste en un milieu nutritif complexe, comprenant des composés à la fois bio-compatibles, biomimétiques et biodisponibles au niveau cutané, à l'exclusion de tout extrait biologique d'origine animale, tel que sérum de veau foetal. Et le milieu nutritif complexe retenu selon l'invention a une composition adaptée pour permettre, en dehors de la phase dans laquelle ledit milieu est distribué, une culture *in vitro* viable d'un inoculum de kératinocyte épidermique humain avec au moins une prolifération clonale de ces derniers au premier passage.

Par "biocompatible", on entend la propriété selon laquelle le composé présente une innocuité au niveau cutané.

Par "biomimétique", on entend le fait que le composé est présent à l'état naturel dans la peau.

Par "biodisponible", on entend la propriété selon laquelle le composé est assimilable par les kératinocytes épidermiques humains, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Par des essais de routine, l'homme de métier est à même de formuler un milieu nutritif complexe selon l'invention, en procédant en particulier avec ledit milieu à des cultures *in vitro* de kératinocytes, dont la croissance peut être observée, par exemple au microscope.

A cet égard, les documents suivants ont déjà décrits des milieux adaptés à des cultures in vitro de kératinocytes, dont la viabilité et la croissance peuvent être objectivées par les tests actuellement en vigueur, et 5 être directement appréciées par observation sous microscope :

- Boyce ST, Ham RG, Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in defined clonal culture and serum-free serial culture, J. 10 Invest. Dermatol. 1983; 81: 33S-40S
- Boyce ST, Ham RG, Cultivation, frozen storage, and clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in serum-free media, J. Tissue Culture Methods. 1985; 9: 83-93.

15 En tant que de besoin, le contenu de ces publications est incorporé à la présente description.

Le milieu nutritif complexe selon l'invention comprend des acides aminés, une ou plusieurs vitamines, un ou plusieurs facteurs de croissance cellulaire, et un ou 20 plusieurs sels minéraux.

L'ensemble des composés présents dans le milieu nutritif selon l'invention étant hydrosolubles, deux voies de formulation peuvent être mises en oeuvre :

25 1) Phase continue aqueuse, contenant le milieu nutritif selon l'invention :

- sous forme de gel aqueux, à l'aide d'un polymère hydrosoluble non ionique du type polysaccharide ou éther de cellulose (polymères compatibles avec la forte charge ionique du milieu);

30 30 - sous forme de système émulsionné (émulsion d'huile dans l'eau faisant appel à des tensio-actifs résistant aux fortes charges ioniques);

- sous forme de sérum cosmétique.

2) Phase continue huileuse, la phase discontinue 35 contenant le milieu nutritif selon l'invention :

- sous forme émulsionnée, étant entendu que la force ionique de la phase discontinue implique l'instabilité de l'émulsion ; il est cependant possible de formuler des phases lamellaire ou cylindrique présentant 5 une meilleure stabilité, ou encore un système bi-phasic remis extemporanément en émulsion par simple agitation;

- par encapsulation :

* dans une capsule rigide, du type polysaccharide, dispersée dans la phase lipidique,

10 * dans une capsule molle, du type gélatine, dispersée dans la phase discontinue.

L'utilisation de liposomes comme vecteur d'encapsulation est envisageable sous forme d'un gel liposomal en phase continue aqueuse.

15 Une composition selon l'invention peut servir de base cosmétique. Son apport nutritionnel est notamment intéressant pour l'amélioration de la viabilité, le maintien de l'intégrité et l'équilibre des cellules cutanées superficielles.

20 L'utilisation d'une telle composition nutritive permet de préserver durablement les qualités intrinsèques primaires de la peau, d'augmenter sa résistance aux agressions et de favoriser, le cas échéant, son retour à un état d'équilibre.

25 De la même façon, l'utilisation d'un tel milieu sur une peau fragilisée (peaux irritées, desséchées, peaux sénescentes,...), permet de retrouver un état cutané satisfaisant tant en terme de trophicité que d'hydratation des couches superficielles de l'épiderme.

30 De manière plus générale, une composition selon l'invention peut être incorporée dans toute préparation cosmétique, en tant que principe actif ou avec d'autres principes actifs, qu'elle est susceptible de potentialiser.

Un milieu nutritif complexe selon l'invention recrée un environnement extra-cellulaire adapté, en fournissant :

- un apport nutritionnel optimisé, aussi bien en vitamines, oligo-éléments, qu'en acides aminés essentiels,
- des facteurs de croissance cellulaire, visant à substituer les interactions cellulaires morphogènes,
- et des caractéristiques de pH et d'osmolarité proches des conditions physiologiques.

Les caractéristiques, applications et avantages de la présente invention sont exposés plus en détails dans les Exemples 1 et 2 et les figures 1 à 3 suivants.

L'Exemple 1 donne un exemple de formulation d'une composition de l'invention.

L'Exemple 2 met en évidence les propriétés d'une composition de l'invention par rapport à des milieux connus, à l'appui du dessin annexé dans lequel :

Fig 1 est une vue en coupe d'épidermes humains après 36 heures de culture dans un milieu commercial standard dénommé MCDB 153,

Fig 2 est une vue en coupe d'épidermes humains après 36 heures de culture dans une solution saline tamponnée (PBS), solution saline équilibrée couramment utilisée en culture cellulaire,

Fig 3 est une vue en coupe d'épidermes humains en culture dans le milieu nutritif de l'invention décrit à l'Exemple 1 à différents temps de culture :

- A : au bout de 12 heures
- B : au bout de 24 heures
- C : au bout de 36 heures

Exemple 1:

Formulation d'une composition de l'invention

TABLEAU 1

COMPOSANTS	Concentration en mg/l.
Acides aminés	
L-Alanine	9,2
L-Arginine HCL	421,4
L-Asparagine (anhydre)	14,2
Acide L-aspartique	4,0
L-Cystéine HCL. H ₂ O	42,0
Acide L-Glutamique	14,8
L-Glutamine	1754,4
Glycine	7,6
L-Histidine HCL. H ₂ O	50,0
L-Isoleucine	6,0
L-Leucine	131,2
L-Lysine HCl	54,0
L-Méthionine	13,5
L-Phénylalanine	10,0
L-Proline	34,6
L-Sérine	126,1
L-Thréonine	24,0
L-Tryptophane	9,3
L-Tyrosine 2 Na 2H ₂ O	11,7
L-Valine	70,3
Vitamines et facteurs de croissance cellulaire	
d-Biotine	0,02
Acide folique	0,80
Nicotinamide	0,04
D-Ca Pantothénate	0,30
Pyridoxine HCl	0,06
Riboflavine	0,04
Thiamine HCl	0,30
Vitamine B ₁₂	0,41
i-Inositol	18,0

Putrescine 2 HCl	0,20
Pyruvate de sodium	55,0
Thymidine	0,73
Adénine (HCl)	24,0
Acide DL-lipoïque	0,20

Composants inorganiques

Chlorure de sodium	6800,0
KCl	112,0
Na ₂ HPO ₄	284,0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,003
Acétate de sodium	300,0 (anhydre)
D-Glucose	1080,0
HEPES (pipérazine)	6600,0
Phosphoryléthanolamine	0,06768
Ethanolamine	0,04684
Sulfate de sodium	3,4
Bicarbonate de sodium	1160,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,39
MgCl ₂ .6H ₂ O	120,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	de 13,0 à 22,05
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,144
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,00120
Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	0,142
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,00002
SnCl ₂ .2H ₂ O	0,00011
NH ₄ VO ₃	0,00057

Exemple 2:

La cytocompatibilité et les performances du milieu nutritif complexe décrit à l'Exemple 1 ont été testées sur 5 des cultures de kératinocytes humains en monocouche, et sur des épidermes humains reconstitués *in vitro*.

Le milieu nutritif selon l'Exemple 1 permet la culture de kératinocytes en monocouche dans des conditions

optimales de viabilité, durant au moins 36 heures, sans que ne se manifeste le moindre effet cytotoxique.

A l'inverse, une solution de survie classique telle que PBS (Phosphate Buffered Saline, solution saline équilibrée couramment utilisée en culture cellulaire) s'avère cytotoxique dès 12 heures d'incubation.

Conformément à la Fig 3, le milieu nutritif selon l'exemple autorise une culture d'épidermes humains normaux reconstitués dans des conditions optimales de viabilité, sans manifestations cytotoxiques même après 36 heures (Fig 3C) de mise en contact. Les cultures présentaient des couches cellulaires basales, spineuses, granuleuses et cornées intactes, orthokératosiques, de stratification régulière et normale.

En comparant la Fig 3C avec la Fig 1, cette dernière illustrant l'utilisation d'un milieu standard MCDB 153, commercialisé notamment par IRVINE SCIENTIFIC, on voit que les performances du milieu de l'invention sont aussi bonnes.

Par contre, l'utilisation de PBS induit, conformément à Fig 2, l'apparition de kératinocytes en phase terminale de différenciation au niveau des assises basales et spineuses, avec des signes de nécrose plus ou moins prononcés, un détachement de l'épiderme de son support et une destructure complète des différentes assises cellulaires.

REVENDICATIONS

1/ Composition à usage topique, comprenant une phase biocompatible avec les parties superficielles du corps humain, dans laquelle est distribué de manière homogène un agent nutritionnel desdites parties superficielles, caractérisée en ce que l'agent nutritionnel consiste en un milieu nutritif complexe, comprenant des composés à la fois biocompatibles, biomimétiques et biodisponibles au niveau cutané, à l'exclusion de tout extrait biologique d'origine animale, ledit milieu nutritif complexe ayant une composition adaptée pour permettre, en dehors de la phase dans laquelle ledit milieu est distribué, une culture viable in vitro d'un inoculum de kératinocytes épidermiques humains, avec au moins une prolifération clonale de ces derniers au premier passage.

2/ Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que le milieu nutritif complexe comprend des acides aminés, au moins une vitamine, au moins un facteur de croissance cellulaire, et au moins un sel minéral.

3/ Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que le milieu nutritif complexe a la composition suivante, la concentration des composants étant exprimée en mg/l :

Acides aminés

L-Alanine	9,2
L-Arginine HCL	421,4
L-Asparagine (anhydre)	14,2
Acide L-aspartique	4,0
L-Cystéine HCL. H ₂ O	42,0
Acide L-Glutamique	14,8
L-Glutamine	1754,4
Glycine	7,6
L-Histidine HCL. H ₂ O	50,0

L-Isoleucine	6,0
L-Leucine	131,2
L-Lysine HCl	54,0
L-Méthionine	13,5
L-Phénylalanine	10,0
L-Proline	34,6
L-Sérine	126,1
L-Thréonine	24,0
L-Tryptophane	9,3
L-Tyrosine 2 Na 2H ₂ O	11,7
L-Valine	70,3

Vitamines et facteurs de croissance cellulaire

d-Biotine	0,02
Acide folique	0,80
Nicotinamide	0,04
D-Ca Pantothénate	0,30
Pyridoxine HCl	0,06
Riboflavine	0,04
Thiamine HCl	0,30
Vitamine B ₁₂	0,41
i-Inositol	18,0
Putrescine 2 HCl	0,20
Pyruvate de sodium	55,0
Thymidine	0,73
Adénine (HCl)	24,0
Acide DL-lipoïque	0,20

Composants inorganiques

Chlorure de sodium	6800,0
KCl	112,0
Na ₂ HPO ₄	284,0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,003
Acétate de sodium	300,0 (anhydre)
D-Glucose	1080,0
HEPES (pipérazine)	6600,0

Phosphoryléthanolamine	0,06768
Ethanolamine	0,04684
Sulfate de sodium	3,4
Bicarbonate de sodium	1160,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,39
MgCl ₂ .6H ₂ O	120,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	de 13,0 à 22,05
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,144
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,00120
Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	0,142
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,00002
SnCl ₂ .2H ₂ O	0,00011
NH ₄ VO ₃	0,00057

4/ Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme biphasique, avec une phase continue aqueuse contenant le 5 milieu nutritif complexe, et notamment sous forme de gel aqueux, ou d'émulsion d'huile dans l'eau.

5/ Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme biphasique, avec une phase continue huileuse, notamment 10 sous forme d'émulsion, la phase discontinue contenant le milieu nutritif complexe.

6/ Base cosmétique comprenant une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

7/ Préparation cosmétique comprenant, notamment à 15 titre de principe actif, une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

1/2

FIG 1

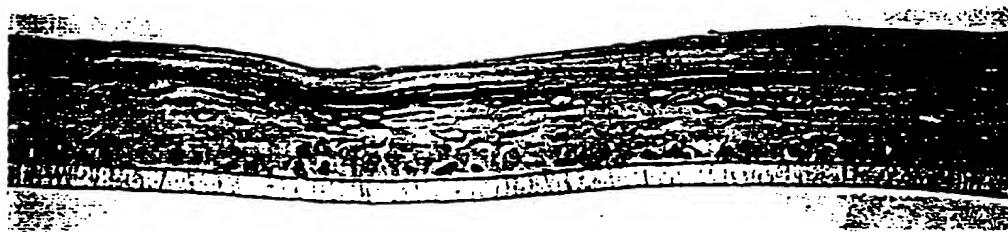


FIG 2

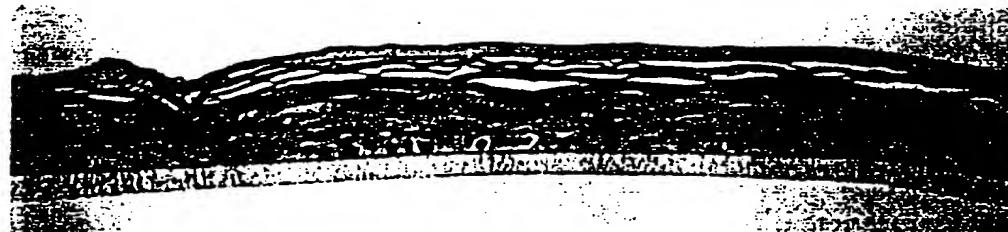


2/2

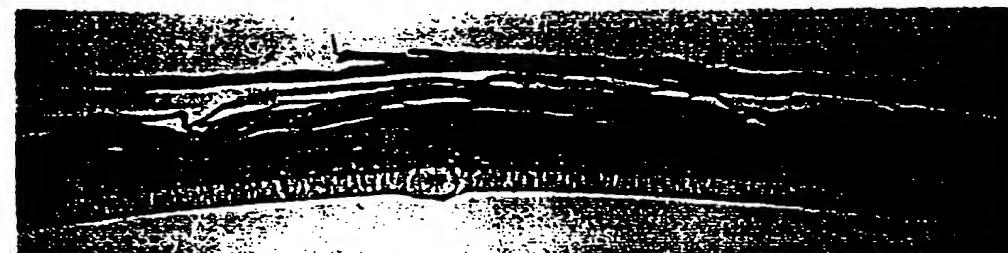
FIG 3



A



B



C